

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月17日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790470

研究課題名（和文） 未熟 T 細胞受容体の自発的会合がもたらす生理的意義

研究課題名（英文） *In vivo* analysis of molecular mechanism for pre-TCR-mediated β -selection

研究代表者

石川 絵里 (ISHIKAWA ERI)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：20546478

研究成果の概要（和文）：プレ T 細胞受容体（プレ TCR）は、T 細胞分化に必須の受容体であるが、リガンドの有無は長年不明であった。本研究では、近年我々が提唱した「プレ T 細胞受容体（プレ TCR）が荷電アミノ酸を介した自発的多量体形成により、リガンド非依存的にシグナルを誘導する」というモデルを *in vivo* で検証するため、荷電アミノ酸を変異させたプレ TCR のノックインマウスを樹立、解析した。その結果、未熟抗原受容体が電荷に依存して自発的にシグナルを伝達していることを、個体レベルで初めて証明した。

研究成果の概要（英文）：The ligand for pre-TCR has not been identified for many years. To verify a model that we have recently proposed *in vivo*, we established mutant pre-TCR α chain (pT α) knock-in mice that lacks charged residues. From analysis of the mice, we first demonstrated that immature antigen receptor spontaneously induces signals through charged residues in pT α *in vivo*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：リンパ球・T細胞分化

1. 研究開始当初の背景

プレ T 細胞受容体（プレ TCR）は TCR β 鎖の完成を細胞に知らせるもので、T 細胞初期分化（ β -セレクション）に必須の受容体であるが（von Boehmer, et al. *Nature* 1995）、リガンドの有無を含め、そのシグナル誘導機構については長年不明であった。

我々は近年、プレ TCR が構成成分であるプレ TCR α 鎖（pT α ）の細胞外領域に存在する4つの荷電アミノ酸を介して自発的に多量体を形成し、リガンド非依存的にシグナルを

誘導するというモデルを提唱した（Yamasaki, Ishikawa, et al. *Nat. Immunol.* 2006, Yamasaki, et al. *Trends. Immunol.* 2007）。本モデルを *in vivo* で検証するためには、荷電アミノ酸を欠いた変異体を野生型と全く同一量、時期、場所で発現させることが極めて重要であり、pT α 変異体ノックインマウスを用いたアプローチが適切であると考えた。そこで、pT α のノックインマウス（D22A/R24A/ R102A / R117A: 4A）の作製を始めた。

2. 研究の目的

我々が同定した pTα の細胞外領域に存在する 4 つの荷電アミノ酸が、実際に個体における T 細胞分化に必須であるか否かを、作製したノックインマウスを用いて *in vivo* で検証する。また最終的には、プレ TCR の自発的シグナルが TCR 多様性獲得に寄与しているか否かを明らかにする。

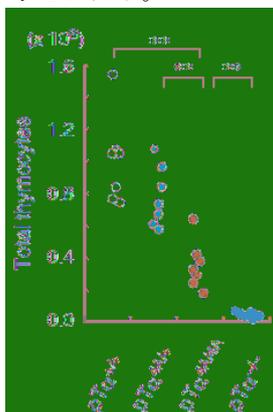
3. 研究の方法

荷電アミノ酸を変異させた pTα ノックインマウス (D22A/R24A/R102A/R117A: 4A) を樹立し、胸腺全細胞数、分化段階ごとの細胞の割合、および分化マーカーの発現レベルを解析することにより、T 細胞分化が障害されているか否かを調べた。また、プレ TCR の自発的多量体形成が TCRβ 鎖の対立遺伝子排除に必須であるか否かを明らかにするため、このマウスを TCRβ 鎖トランスジェニックマウスと交配し、β 鎖遺伝子再構成に及ぼす影響を解析した。最終的には、ノックインマウス由来の TCRβ 鎖のレパトアを解析することにより、リガンド非依存的な“緩い”選択過程が TCR 多様性獲得に寄与しているか否かを検討した。

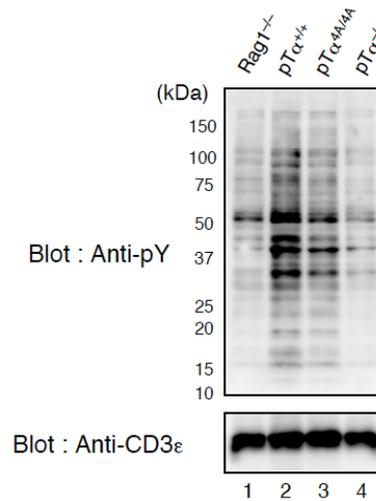
4. 研究成果

(1) 変異体 pTα ノックインマウス (D22A/R24A/R102A/R117A: 4A) では T 細胞初期分化が障害される

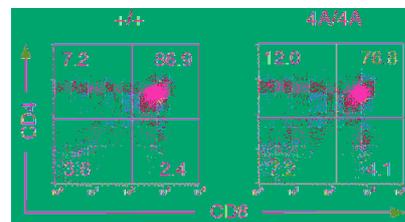
当該マウスを解析したところ、野生型と比較して、胸腺細胞数の顕著な減少が見られ (図 1)、若週齢では末梢のリンパ組織である脾臓においても T 細胞数の減少が見られた。また、プレ TCR シグナルにより誘導される、下流シグナルタンパク質のリン酸化 (図 2)、細胞増殖、ダブルネガティブ (CD4⁻CD8⁻) からダブルポジティブ (CD4⁺CD8⁺) 細胞への分化 (図 3) が全て減弱していることが明らかとなった。さらに、野生型と比較して細胞表面におけるプレ TCR の発現が高かったことから、野生型では荷電アミノ酸を介した自発的多量体形成により、プレ TCR が恒常的に細胞内に取り込まれているものと考えられる。



(図 1) 胸腺全細胞数の比較



(図 2) プレ TCR シグナル下流分子のリン酸化



(図 3) 胸腺細胞のダブルネガティブ、ダブルポジティブ細胞の割合

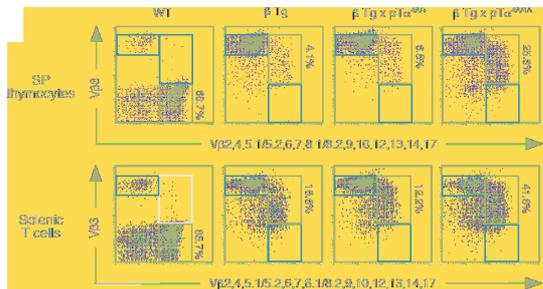
(2) 変異体 pTα ノックインマウスでは TCRβ 鎖遺伝子再構成の抑制 (allelic exclusion) が障害される

通常、遺伝子再構成により TCRβ 鎖が完成すると、プレ TCR を形成し、このプレ TCR を介したシグナルにより、もう一方のアリルの遺伝子再構成が抑制される。これは TCRβ 鎖遺伝子再構成の抑制 (allelic exclusion) と呼ばれ、1 個の T 細胞に 1 種類の TCR が発現することを保障する機構である。既に再構成されている TCRβ 鎖をトランスジェンとして導入すると、実際の β 鎖完成時と同様に内在性の β 鎖遺伝子再構成が両アリル共に抑制されることが知られている。この現象を利用して、変異体 pTα ノックインマウスと TCRβ 鎖トランスジェニックマウスを交配し、得られたマウスの β 鎖遺伝子再構成を PCR により解析した。その結果、ゲノムレベルで allelic exclusion が障害されていることが明らかとなった (図 4)。また、胸腺細胞および脾臓細胞の細胞表面染色により、変異体 pTα ノックインマウスでは、2 種類の TCRβ 鎖を発現する細胞の出現が顕著に認められた (図 5)。以上の結果から、荷電アミノ酸を介した適切なプレ TCR シグナルは、1 個の T 細胞がただ 1 種類の TCR を発現するという原則を担保する意味でも重要な役割を担っていることが明らかとなった。このような TCR の dual

expresser がウイルス感染時の自己免疫疾患発症に関与しているとの報告もあり、荷電アミノ酸を介したプレ TCR シグナルの破綻が、そのような危険な状況を引き起こす可能性も考えられる。



(図4) pTα^{4A/4A} マウスでは allelic exclusion が障害される



(図5) pTα^{4A/4A} マウスでは2種類の TCRβ鎖を発現する細胞が顕著に認められる

(3) 変異体 pTα ノックインマウスでは TCRβ 鎖レパトアが変化している

T 細胞初期分化が障害されている当該マウスを用いて、プレ TCR の自発的シグナルが実際に TCR 多様性獲得に寄与しているか否かを検討した。未熟 T 細胞の細胞表面染色により、TCRβ 鎖レパトアを調べたところ、当該マウスでは野生型と比較して変化が見られた。更に、当該マウスよりプレ TCR シグナルを受けた後のダブルポジティブ細胞を分取し、RT-PCR により得た TCRβ 鎖のシーケンスを行った。100 前後の TCRβ 鎖のアミノ酸配列を解析したところ、TCRβ 鎖の多様性を生み出しているともいふべき配列部位 (CDR3) について、野生型では様々な長さのものが比較的同程度あるのに対し、変異体

pTα ノックインマウスでは偏りが見られた。これらの結果から、荷電アミノ酸を介した自発的なプレ TCR シグナルは、適切な TCR レパトアの形成と多様な TCR β 鎖の獲得に寄与している可能性が示唆された。

以上の結果から、未熟抗原受容体が電荷に依存して自発的にシグナルを伝達していることが、個体レベルで初めて明らかとなった。また、荷電アミノ酸を介した適切なプレ TCR シグナルが、適切な TCR レパトアの形成に寄与していることが強く示唆された。

今後は、プレ TCR の自発的シグナルの TCR 多様性獲得への寄与を、次世代シーケンサーを用いた共同研究により更に詳細に解析して行く予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Eri Ishikawa, Yasunobu Miyake, Hiromitsu Hara, Takashi Saito and Sho Yamasaki : Germ-line elimination of electric charge on pre-T-cell receptor (TCR) impairs autonomous signaling for β-selection and TCR repertoire formation., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107: 19979-19984, 2010. 査読有

[学会発表] (計2件)

① ISHIKAWA Eri, MIYAKE Yasunobu, SAITO Takashi and Yamasaki Sho TCR レパトア形成におけるβ-selection の意義 /The essential role of β-selection in TCR repertoire formation 第40回日本免疫学会総会・学術集会 平成23年11月27日 幕張メッセ (千葉)

② 石川絵里、三宅靖延、斉藤隆、山崎晶 TCR レパトア形成におけるβ-selection の意義 第20回 Kyoto T Cell Conference 平成22年6月4日 京都大学医学部芝蘭会館

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/labo/molimm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 絵里 (ISHIKAWA ERI)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：20546478

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：